

古 賀 信 康（教授（兼任*））（2022 年 10 月 1 日～2023 年 9 月 30 日）

小杉 貴洋（助教）

鈴木 規子（技術支援員）

鈴木 博子（事務支援員）

*大阪大学蛋白質研究所

A-1) 専門領域：生物物理学，タンパク質分子デザイン

A-2) 研究課題：

a) 計算機および生化学的アプローチによるタンパク質分子デザイン

A-3) 研究活動の概略と主な成果

望みの機能を持ったタンパク質分子を自在にデザインすることが可能になれば，細胞の制御・設計や医療への貢献，加えて新規酵素やマテリアル開発による産業への応用が期待される。我々は，タンパク質分子を主鎖構造から完全にゼロからデザインすること，更には自然界のタンパク質分子を改造することで，望みのタンパク質分子を創製する理論と技術の開発を行う。

- a) 回転対称多量体タンパク質のデザイン；多くのタンパク質は 3 次構造を形成した後に 4 次構造を形成することで機能を発現する。これまでにデザインしたタンパク質をビルディングブロックとして組み合わせることで，多様な形状の新規回転対称多量体をデザインする技術を開発する。これまでに開発した技術を用いて，2 量体および 5 量体の設計に成功し，6 量体に関してもデザインしたタンパク質のひとつが，6 量体を形成していることを示唆する結果を得ている。
- b) ヘム結合タンパク質のデザイン；これまでにデザインしたタンパク質をビルディングブロックとして組み合わせることで，望みの小分子に結合するタンパク質分子をデザインする手法の開発を行う。特に，ヘム結合タンパク質を例として研究を行っている。これまでにデザインしたタンパク質を，2 量体のコイルドコイルを形成する α ヘリックスの NC 末端それぞれに連結させることで，連結したドメイン間に小分子結合サイトを構築し，ヘム結合タンパク質をデザインした。デザインしたタンパク質 5 つを発現，精製したところ，1 つについて収量が多く，また 2 量体を形成しているものがあり，ヘム滴定を行ったところ，ヘム結合を示唆する結果が得られている。
- c) ATP 結合タンパク質のゼロからのデザイン；自然界には ATP を加水分解して動的機能を発現するタンパク質が存在する。タンパク質が ATP を加水分解するためのミニマムな装置を明らかにすることを目的とし，まず ATP を結合するタンパク質のゼロからのデザインを行った。これまでに発見した 3 つのルールとヌクレオチド結合に重要とされる P-loop モチーフを用いることで，計算機上で ATP 結合タンパク質のデザインを行った。生化学実験により，デザインしたタンパク質は安定な構造を形成し，ATP に対して 800 μ M くらいの結合親和性を示した。さらに，結晶化して構造を解くことにより，設計通りの構造をしていることを確認した。今後は，より活性を向上させることを目指す。
- d) 動的機能を発現する自然界のタンパク質 V-ATPase の改造；自然界には，ATP 加水分解のエネルギーを利用して構造変化することで機能を発現するタンパク質が存在する。このようなタンパク質がどのようにして動的機能を発現しているのか，回転モータータンパク質である V-ATPase を改造することで，そのメカニズムに迫った。V-ATPase の非触

媒活性部位に、ヌクレオチド結合サイトを設計することで、V-ATPaseに新規アロステリック機構を付与し、V-ATPaseの回転を加速することに成功した。さらに、ここで設計したV-ATPaseと天然のV-ATPaseを比較することで、天然のV-ATPaseの複合体状態に関する知見も得られている。

- e) タンパク質構造の合理安定化法の開発；タンパク質の耐熱性を向上させることは、タンパク質を産業利用する上で重要である。タンパク質をゼロからデザインする技術を応用して、自然界のタンパク質を合理的に安定化する手法の開発を行った。開発した手法を用いて、PET製品のバイオリサイクルに重要なPET分解酵素の安定化に成功した。
- f) α ヘリカルタンパク質構造のゼロからのデザイン； α ヘリカル構造を自在にデザインするための手法の開発を行った。まず自然界のタンパク質構造を解析し、ヘリックス同士をつなぐ典型的なループパターン18種を明らかにしている。これらのループパターンを組み合わせることで、計算機上で疎水性コアパッキングを形成し、加えて表面形状が多様な α ヘリカル構造を構築する手法を開発した。さらに、これら α ヘリカル構造に対して、側鎖-側鎖もしくは主鎖-側鎖水素結合が形成されるよう側鎖設計の手法を開発した。また、これまでは5、6本の α ヘリックス構造しか設計することができなかったが、それ以上の本数の α ヘリックスからなる α ヘリカル構造を設計するための手法を開発した。

B-1) 学術論文

T. KOSUGI, T. IIDA, M. TANABE, R. IINO and N. KOGA, “Design of Allosteric Sites into Rotary Motor V_1 -ATPase by Restoring Lost Function of Pseudo-Active Sites,” *Nat. Chem.* **15**, 1591–1598 (2023). DOI: 10.1038/s41557-023-01256-4

S. MINAMI, N. KOBAYASHI, T. SUGIKI, T. NAGASHIMA, T. FUJIWARA, R. TATSUMI-KOGA, G. CHIKENJI and N. KOGA, “Exploration of Novel $\alpha\beta$ -Protein Folds through De Novo Design,” *Nat. Struct. Mol. Biol.* **30(8)**, 1132–1140 (2023). DOI: 10.1038/s41594-023-01029-0

K. SAKUMA, N. KOBAYASHI, T. SUGIKI, T. NAGASHIMA, T. FUJIWARA, K. SUZUKI, N. KOBAYASHI, T. MURATA, T. KOSUGI, R. TATSUMI-KOGA and N. KOGA, “Design of Complicated All- α Protein Structures,” *Nat. Struct. Mol. Biol.* **31**, 275–282 (2024). DOI: 10.1038/s41594-023-01147-9

Y. KAMADA, C. UMEDA, Y. MUKAI, H. OHTSUKA, Y. OTSUBO, A. YAMASHITA and T. KOSUGI, “Structure-Based Engineering of Tor Complexes Reveals that Two Types of Yeast TORC1 Produce Distinct Phenotypes,” *J. Cell Sci.* **137**, jcs261625 (2024). DOI: 10.1242/jcs.261625

B-3) 総説、著書

小杉貴洋, 「タンパク質設計技術で分子モーターを加速する」, 現代化学, 2023年11月号 (**632**), 24–27 (2023).

小杉貴洋, 「失われた機能を復活させてアロステリック部位を設計する方法：回転型分子モーター V_1 -ATPase で実証」, 蛋白質科学会アーカイブ, **16**, エッセイ 013 (2023).

B-4) 招待講演

小杉貴洋, 「蛋白質複合体が生み出す協奏的な機能の合理的な制御を目指して」, 第23回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「加速するタンパク質デザイン」, 名古屋, 2023年7月.

古賀信康,「De novo design of proteins with novel folds: How many possible folds exist?」, 生体機能関連化学部会若手の会第 34 回サマースクール, 愛知, 東浦町, 2023 年 7 月.

古賀信康,「De novo design of proteins with topologies not found in nature」, 理研シンポジウム: Synthetic Biology—生物学の新たな潮流—, 理化学研究所, 和光, 2023 年 8 月.

小杉貴洋,「タンパク質設計技術による細胞内回転型分子モーターの制御を目指して」, 第 12 回分子モーター討論会, 仙台, 2023 年 9 月.

小杉貴洋,「計算機設計技術を用いたスーパー酵素の創出」, 第 96 回日本生化学会大会シンポジウム「情報計算科学にもとづく酵素の創成と応用～スーパー酵素が切り拓く生化学の新時代～」, 福岡, 2023 年 11 月.

小杉貴洋,「Toward understanding roles of yeast Tor complexes by structure-based engineering approach」, 第 61 回日本生物物理学会 シンポジウム「トア複合体による細胞応答の仕組みを理解する」, 名古屋, 2023 年 11 月.

小杉貴洋,「Toward developing a new field of biology based on protein design」, The 2157th NIG Biological Symposium, 三島, 2023 年 11 月.

古賀信康,「Basis for Protein Design」, 計算生命科学の基礎 10——融合する AI, データサイエンス, 生命科学, そして次の 10 年を見据えて——, オンライン開催, 2023 年 11 月.

小杉貴洋,「タンパク質設計技術による定量生物学を目指して」, 定量生物学の会第十一回年会, 東京, 2024 年 1 月.

小杉貴洋,「Allosteric control of rotary molecular motor by using protein design method」, OIST-JST Joint Meeting, 沖縄, 2024 年 1 月.

小杉貴洋,「構造解析が導くタンパク質の設計・改造とその理解」, 2023 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 水戸, 2024 年 3 月.

小杉貴洋,「タンパク質設計技術は単細胞生物研究に役立つのか?」, 2023 年度国立遺伝学研究所研究会「微生物の細胞複製システムから紐解く生命のデザイン」, 三島, 2024 年 3 月.

古賀信康,「合理デザインによる新規タンパク質の創製」, 新潟大学コアステーション「ユビキタスグリーンケミカルエネルギー (UGCE) 連携教育研究センター」主催第 14 回研究シンポジウム, 新潟, 2024 年 3 月.

N. KOGA, “Design of protein structures from scratch: The number of possible topologies ?” The 20th ABC-InFO Lecture and Networking, Online, February 2024.

N. KOGA, “Exploration of novel protein folds through de novo design,” The molecular organization of living systems, Aarhus University, Aarhus (Denmark), September 2023.

T. KOSUGI, “Allosteric control of rotary molecular motor V₁-ATPase by redesigning pseudo-active sites,” The East Asia Single-Molecule Biology Symposium 2023, Wenzhou (China), September 2023.

N. KOGA, “Exploration of novel protein folds through de novo design: How many possible folds exist?” The 21st KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), October 2023.

N. KOGA, “Laboratory for Protein Design,” IPR Retreat 2023, 大阪大学銀杏会館, Osaka (Japan), November 2023.

T. KOSUGI, “Control of functions exerted by protein complexes using protein design methods,” 16th Eurasia Conference on Chemical Sciences 2023, Bangkok (Thailand), December 2023.

N. KOGA, “Exploration of novel protein topologies through de novo design,” The 27th SANKEN International Symposium: Science Chat in AI and Metaverse, The Awaji Yumebutai, Awaji (Japan), January 2024.

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会分野別専門委員：タンパク質設計・ドラッグデザイン (2015–2023).

学会の組織委員等

第 23 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「高次構造体のはたらきを観る！」オーガナイザー (2023). (小杉貴洋)

第 61 回日本生物物理学会年会実行委員 (2023). (小杉貴洋)

第 61 回日本生物物理学会年会シンポジウム「トア複合体による細胞応答の仕組みを理解する」オーガナイザー (2023). (小杉貴洋)

学会誌編集委員

生物物理学会誌編集委員 (2022–).

B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(B), 「多様な形状の新規回転対称多量体タンパク質の合理デザイン」, 古賀信康 (2022 年度–2024 年度).

自然科学研究機構 OPEN MIX LAB (OML) 公募研究プログラム (研究共創型), 「新規タンパク質デザインによる糖鎖修飾ルールの解明」, 古賀信康 (2023 年度).

科学技術振興機構 さきがけ研究, 「タンパク質複合体を合理的に改造し, 細胞内機能を理解・制御する」, 小杉貴洋 (2020 年度–2023 年度).

自然科学研究機構 ExCELLS 若手奨励研究, 「人工設計タンパク質を多量体化することでヘム結合部位を創る」, 小杉貴洋 (2021 年度–2023 年度).

B-11) 産学連携

共同研究, キリンホールディングス (株), 「PET 分解酵素の開発」, 古賀信康 (2022 年–2023 年).

C) 研究活動の課題と展望

これまでの研究活動により様々な形状のタンパク質構造を設計する技術の開発に成功した。蛋白研では, これらの技術を用いて機能タンパク質を設計するとともに, 設計したタンパク質構造をビルディングブロックとして組み合わせ, より巨大かつ複雑な形状のタンパク質を設計する技術開発に取り組む。